

研究材料としての遺伝子資源の保全、有効利用の為の遺伝子
資源バンクについて

Establishment of Research Resources Banks for human or other
mammalian sources including cells, genes, tissues and embryos

竹島 勉

Tsutomu Takeshima

(財) ヒューマンサイエンス振興財団

ヒューマンサイエンス研究資源バンク

590-0535 大阪府泉南市りんくう南浜2-11

Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research
Resources Bank

Rinku-Minamihama 2-11, Sennan-shi, Osaka 590-0535, Japan

貴重な野生動物や研究材料として有用な遺伝子資源を保全し、有効に利用するためには卵子、胚および精子など極めて小さく単純な構造のものを凍結保存する必要性がある。1972年に Whittingham ら1) が DMSO を保存液としてマウス胚を緩慢凍結で成功してから30年、その間、現在、一般的な凍結胚として用いられている体外受精2細胞期胚の緩慢凍結さらに急速凍結法が確立された2-6)。また、融解後の希釈に Sucrose 液を用い

ることで胚の生存性の向上をもたらした。マウス精子の凍結保存は1990年代に急速に進展し、種々の凍害保護物質が検討され18%ラフィノース+3%スキムミルクの保存液(R18S3)が一般的に使用され、二段階急速凍結が確立された7-11)。しかし、胚ならびに精子の凍結保存は系統間により凍結・融解後の生存性に違いがあり、まだ、改良の余地が残されている。

一方、ラットでは2細胞期胚の緩慢凍結12)が実用化されているが、急速

凍結はまだ研究段階の域を抜けていない。精子の凍結保存に関しては、凍結融解した精子の人工授精¹³⁾あるいは顕微受精 (ICSI)¹⁴⁾で産仔を得る研究が近年報告され、今後の研究が期待されている。現在、疾患モデル、トランスジェニック、ノックアウト、X-rayあるいは化学物質 (ENU: エチレンニトロソウレア等) によるミュータントなど年々多様性および多因子表現型の動物が増大しており、その数は10万とも20万とも、いやそれ以上の系統数になると予想され、研究現場では、動物の開発、系統維持、研究、資源の保存等と多忙きわまりない状態になってきている。これに対応するため国内外に多くの胚バンクが設立されている。アメリカではジャクソン研究所 (Bar Harbor, Maine)、ヨーロッパでは英国の MRC (Medical Research Council: Harwell)、イタリアの EMMA (European Mouse Mutant Archive: Monterotondo)、フランスの CNRS (Centre National De La Recherche Scientifique: Paris)、ドイツの GSF (Gesellschaft fuer Strahlen Forschung: Munich)、アジアでは中国の上海実験動物研究センターなどがある。国内では熊本大学動物資源開発研究センター (CARD: Center for Animal Resources and Development)、理化学研究所バイオリソースセンター (BRC: Bio Resource Center)、民間企業で関東の三菱化学生命科学研究所、九州の (株) ARK リソースがマウス胚および精子

のバンク事業を行っている。著者らの動物胚バンク (HSRRB: Health Science Research Resources Bank) は2000年代に入り研究資源の重要性が増大している背景のもと、国の補正予算による「創薬知的基細胞・遺伝子盤整備事業」において、研究資源の充実を図るため、ヒト組織バンクとともに2002年に新設された。HSRRBには動物胚バンクの他に細胞バンク、遺伝子バンク、ヒト組織バンクと資源情報を管理するデータベース部門から構成されている。細胞バンクと遺伝子バンクは財団法人ヒューマンサイエンス振興財団が、1955年研究基盤整備を目的として1955年よりHSRRBを開設し、細胞・遺伝子の収集、標準化、品質管理、保存管理、供給事業を実施しており国内および海外の研究者に提供可能な培養細胞数686種、遺伝子9,742クローン、ヒト3組織が保存され、研究機関に分譲した数は2001年実績で細胞2,766 (海外307)、遺伝子75 (海外1) である。

動物胚バンクで保管されている系統は国立感染研究所から導入2細胞期胚 (EL てんかんマウス、ICGN/Mネフローゼマウス、Yok: ICR、MPSマイコプラズマ易感染性マウス、YPC貧毛マウス、BKO: β -ガラクトシターゼノックアウトマウス)、精子 (BH: β -ガラクトシターゼノックアウトマウス、CG18: ヒト β -ガラクトシターゼ発現 Tg マウス、Gal B48 および Gal F89: ヒト変異型 β -ガラクトシターゼ発現 Tg マウス) の10系統とワイエス

ニューテクノロジー研究所から導入 2細胞期胚 (キノホルム感受性ラット、キノホルム抵抗性ラット、GFP : Green Fluorescent Protein Tg ラット) の 3 系統および国立循環器病センターから GFP マウス精子の 1 系統、計 14 系統である。この内、GTP・Tg ラット 2細胞期胚 647 個 (27 サンプル) が分譲可能な系統である。現在、分譲用の系統数を増やすためマウス 4 系統 (EL てんかんマウス、ICGN/M ネフローゼマウス、MPS マイコプラズマ易感染性マウス、BOK ノックアウト) の凍結 2細胞期胚を融解・移植し、産仔を育成している。これらのマウスから 2細胞期胚および精子を摘出し、微生物検査等の品質検査をした後、凍結保存を行い HSRRB ホームページ (http://www.jhsf.or.jp/index_b.html) に公開する予定である。GTP・Tg ラット胚については、当胚バンクのこれからの事業のテストケースとして位置づけ、生物材料を保管管理し、研究者に材料の情報を公開するとともに事務的手続きの窓口になり研究者からの依頼に対応して資源を速くそして有効に利用させ、その後、研究成果や資源に関係する研究者の意見を調査し、改善に努めていく。これは現在、系統を樹立した研究者や研究機関に系統分与のために費やされる多くの作業から開放し、本来の研究に集中できる分業システムなおかつバンクにおいても事務外渉、保存、品質管理、

情報管理等の業務整備を検討する資料である。

生物資源バンクは研究開発に有用なヒト疾患モデルや多因子表現型の系統の収集保管、資源の品質管理、供給の整備ならびに関連機関とのネットワークが可能なデータベースの整備が必須である。また、生物資源を寄託・分譲する際の国際ルール (生物多様性条約 CBD: Convention on Biological Diversity) が整備されつつある中、海外や国立機関と企業間の資源の収集・供給には資源に対する責任、利害関係を明確にするため遺伝子資源移転契約 (MTA: Material Transfer Agreement) を結び、事前の同意 (IC: Prior Informed Consent) と利益の分配を明確にする必要がある。

おわりに

内外に多くの胚バンクが設立される中、比較的小規模な当バンクでは、企業、大学、各種研究機関の実験動物を用いた研究者の実験をサポートするため、国内外のバンク施設や各種研究機関と協力し、資源情報の公開、研究者のニーズ調査、資源の収集、保管・品質管理の充実、分譲に係わる書類整備、資源受付の窓口、資源発送の手配、技術面での補助ならびに利用資源の研究成果の収集などの事業を進めてく。特に希少な研究資源のラットを中心に胚および精子の収集保存に微力ながら力を注ぎたいと考える。

文献

マウス胚の凍結保存

1. Whittingham D.J., Leibo, S.P. and Mazur, P. : Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science* 178, 411-414, 1972.
2. 豊田 裕, 竹島 勉, 体外受精由来マウス胚の凍結保存, 家畜繁殖誌, 24: 1978.
3. Nakao K., Nakagata N. and Katssuki M. : Simple and efficient procedure for cryopreservation of mouse embryos by simple vitrification. *Exp. Anim.* 46, 231-234, 1997.
4. 中瀨直己 : マウス胚・精子の凍結保存とバンクシステム. *アニテック* 14, 134-139, 2002.
5. Rall W.F. and Fahy G.M. : Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313, 573-575, 1985.
6. Renard J.P., Babinet C. : High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. *J.Exp.Zool.* 230, 443-448, 1984.

マウス精子の凍結保存

7. 奥山 学, 磯貝滋樹, 佐賀正彦, 浜田 宏, 尾川昭三 : マウス凍結精子の体外受精及び人工授精試験. *日本受精着床学会誌* 7, 116-119, 1990.
8. Tada N., Sato M., Yamamoto J., Mizorogi J., Kasai K. and Ogawa S. : Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *J.Reprod.Fert.* 89, 511-516, 1990.
9. 横山峯介, 秋葉久弥, 勝木元也, 野村達次 : 凍結保存マウス精子の体外受精による正常産仔の作成. *日本実験動物学会誌* 39(1), 125-128, 1990.
10. 竹島 勉, 中瀨直己, 尾川昭三 : マウス精子の凍結保存. *実験動物* 40, 493-497, 1991.
11. Nakagata N. and Takeshima T. : High fertilizing ability of mouse spermatozoa diluted slowly after cryopreservation. *Theriogenology* 37, 1283-1291, 1992.

ラット胚・精子の凍結保存

12. Hirabayashi M., Takahashi R., Sekiguchi J. and Ueda M. : Viability of transgenic rat embryos after freezing and thawing. *Exp. Anim.* 46, 111-115, 1997

13. Nakatsukasa E., Inomata T., Ikeda T., Shino M. and Kashiwazaki N.:
Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with
epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C . *Reproduction* 122,
463-467, 2001
14. Hirabayashi M., Kato M., Aoto T., Sekimoto A. Ueda M., Miyoshi I., Kasai
N. and Hochi S. : Offspring derived from intracytoplasmic injection of
transgenic rat sperm. *Transgenic Research* 11, 221-228, 2002.